

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公表特許公報(A)

平5-500007

⑬ 公表 平成5年(1993)1月14日

⑭ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

C 12 N 5/20
15/06
C 12 P 21/08

8214-4B※

(全10頁)

⑯ 発明の名称 組換えウシソマトロビンにおけるアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体

⑰ 特 願 平2-513358

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)1月31日

⑲ 出 願 平2(1990)7月16日

⑳ 国際出願 PCT/US90/03879

㉑ 国際公開番号 WO91/02080

㉒ 国際公開日 平3(1991)2月21日

優先権主張 ㉓ 1989年8月4日 ㉔ 米国(US) ㉕ 389,833

⑳ 発 明 者 エバンス, ダイアン・マリー アメリカ合衆国ミシガン州49007、カラマズー、アパートメント・
1ービー、エヌ・セイジ223番㉑ 出 願 人 ジ・アツプジョン・カンパニー アメリカ合衆国ミシガン州49001、カラマズー、ベンリエツタ・ス
トリート301番

㉒ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CA, CF(広域
特許), CG(広域特許), CH(広域特許), CM(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特
許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK,
LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE
(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. rbStのアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体を
生産するハイブリドーマ。2. ATCC# HB-10181である、請求の範囲第1項に記
載のハイブリドーマ。3. アセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体であって、
遊離のリジンアミノ酸のα-アセチル基とε-アセチル基とを区別す
ることのできる抗体。

4. 抗p17 rbSt分子である、請求の範囲第3項に記載の抗体。

5. ハイブリドーマATCC# HB-10181により生産され
る、請求の範囲第3項に記載のモノクローナル抗体。6. IgGクラスに属する、請求の範囲第3項に記載のモノクロ
ーナル抗体。7. a) rbStのアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体
をrbSt試料に接触させ;

b) rbStと接触している該モノクローナル抗体を、該モノクロ

ーナル抗体とrbStのアセチル化リジン残基との間に免疫学的複合
体を形成するのに十分な時間および条件下で保持し; 次いで

c) 得られた該免疫複合体の量を検出する;

工程からなることを特徴とする組換えにより生産されたbStにお
けるアセチル化の割合を定量する方法。8. a) 該モノクローナル抗体を該rbSt試料に接触させる前に、ま
ず、該試料を固体支持体上に固定化し;

b) 該結合rbSt試料を次いで該モノクローナル抗体と接触させ;

c) 該モノクローナル抗体と結合rbStとの接触を、第1の免疫学
的複合体を形成するのに十分な時間および条件下で保持し; 次いでd) 該第1の免疫学的複合体を、結合rbStと免疫学的複合体を形
成していないモノクローナル抗体を洗い流すことにより検出し、該
第1の免疫学的複合体を次いで第2の抗体と接触させて、該第2の
抗体と該第1の免疫学的複合体とからなる第2の免疫複合体を形成
させ、該第2の抗体には検出可能な指示薬が取り付けられている、

請求の範囲第7項に記載の方法。

9. rbS t のアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体が
ハイブリドーマ ATCC # HB-1 0 1 8 1 により生産される、請
求の範囲第 7 項に記載の方法。

組換えウシソマトトロピンにおけるアセチル化

リジン残基に対するモノクローナル抗体

発明の分野

本発明は、ハイブリドーマ技術およびこの技術を用いたモノクローナル抗体の製造に関する。さらに詳しくは、本発明は、異種ポリペプチド、特に、組換えウシソマトトロピン (rbS t) におけるアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ、それにより生産されたモノクローナル抗体、および該モノクローナル抗体を rbS t のアセチル化リジン残基の検出および定量に用いる方法に関する。

発明の背景

天然のタンパク質、すなわち、通常生体内で生産されるタンパク質におけるリジン残基のアセチル化は、宿主生物により誘導される

翻訳後修飾である [オールfrey・ブイ・ジイ (Allfrey, V. G.) ら、1983, 「ポスト・トランスレーショナル・コバレント・モディフィケーション・オブ・プロテインズ (Post-translational Covalent Modification of Proteins)」、ビイ・コンナー・ジョンソン (B. Conner Johnson) 編、(アカデミック・プレス (Academic Press)、NY)、頁 181-199; ウォルド・エフ (Wold, F.)、1981、アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (Annual Rev. Biochem.)、50: 783]。この現象は、ヒストン [ミュラー・エス (Muller, S.) ら、1987、モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology) 24: 779]、クラミドモナス属の α -チューブリン [ピペルノ・ジイ (Piperno, G.) ら、1985、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. Cell Biol.) 101: 2085; エル・ヘルナウルト・エス・ダブリュー (L'Herault, S. V.) ら、1985、バイオケミストリー (Biochem.) 24: 473; エル・ヘルナウルト・エス・ダブリューら、1983、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー 97: 258]、および低密度リポタンパク質 (LDL) [シュタインブレッカー・ユー・ピー (Steinbrecker, U. P.) ら、1984、ジャ

ーナル・オブ・リピッド・リサーチ (J. Lipid Research) 25: 1109] において研究されている。

組換えウシソマトトロピン (すなわち、組換え DNA 法により生産されるウシソマトトロピン) つまり rbS t は、ウシの乳汁分泌および成長を増大させるのに重要である。rbS t では、主として 157 位、167 位、171 位および 180 位にあるリジン残基がアセチル化されていると報告されている (米国特許出願第 07/323, 901 号 (1989 年 3 月 15 日付で出願) を参照; この米国特許出願は参考文献として、ここに援用する)。アセチル化は、他の rbS t 不純物 (例えば、アミノ酸残基 99 のアスパラギンがイソアスパラギン酸に置換されており、脱アミド化を受けている rbS t) に加えて、このタンパク質の等電点 (pI) を 8.2 から 7.0 に変化させる。アセチル化型 rbS t は、rbS t の pI 7.0 バンドの 67%、つまり発酵により生産された全 rbS t の 15-30% を占める。さらに、公表された研究によれば、ヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンのリジンを化学的にアセチル化すると、これら分子の体細胞性レセプタとの結合を低

特表平5-500007 (3)

減化または阻害するので [テール・エル・シー (Teh, L. C.) ら, 1988, バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Comm.) 150:391; デ・ラ・エルローサ・ビー (de la Llosa, P.) ら, 1985, フェブズ・レターズ (Febs. Letters) 191:211; および マルタル・ジェイ (Martal, J.) ら, 1985, フェブズ・レターズ 180:295)], 獣医学分野における薬剤としては望ましくない。したがって、rbS1 をアセチル化リジンの存在および量について試験する効率的で効果的な方法が望ましい。また、アセチル化rbS1 をアセチル化されていない天然種から精製するのが望ましいであろう。

従来の研究報告では、ジアセチル化、モノアセチル化および非アセチル化のヒストン H4 に結合するモノクローナル抗体 (MAB) の製造と、トリアセチル化 H4 およびジアセチル化 H4 と反応するポリクローナル抗体を含む抗血清の製造とについて述べられている [ミューラー (前出) を参照]。アセチル化型 α -チューブリンについて特異的な MAB が報告されている [ビベルノ (前出) を参照]。また、

記のミューラーらは、マウスをトリアセチル化ヒストン H4 で免疫することにより、10種類の MAB を得ている。これらの MAB は、いずれもアセチル化型 H4 に対して完全に特異的ではなく、トリアセチル化 H4 に対しては検出し得るような反応を示さない。さらに、ミューラーらは、トリアセチル化 H4 およびジアセチル化 H4 に対して強く反応する抗血清を教示している。該ミューラー抗体は、H4 に特異的である。これらの抗体は、他のアセチル化タンパク質と交差反応を起こさない。ミューラーらは、一般的には組換えタンパク質、さらに詳しくは rbS1 について言及していない。

上記のビベルノらは、アセチル化型 α -チューブリンに特異的であると思われる7種類の MAB について言及している。しかし、これらの抗体は、いずれもアセチル化リジンだけを認識するのではない。これらの抗体は、 α -チューブリン分子の存在を必要とする。ビベルノらは、rbS1 に関係する MAB について何も述べておらず、しかも組換えタンパク質に関係する MAB について何も一般的には述べていない。

アセチル化 L D L に対して生じた抗体 [シュタインブレッシャー (Steinbrecher) (前出)] だけでなく、テトラアセチル化型の H4 ヒストンを特異的に認識する抗体 [フェッファー・ユー (Pfeffer, U.) ら, 1985, ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 261:2496] も調製されている。

アセチル化されたリジン残基自体に特異的な抗体がアセチル化度と無関係に利用できるのであれば、アセチル化の存在を検出するのは容易となろう。

情報の開示

タンパク質におけるアセチル化リジンの存在および位置は、N末端配列決定法および高速原子衝撃 (FAB) 質量分析法により決定されるが、これらの方法は、組換え DNA 法により製造されたタンパク質ロット中におけるアセチル化不純物を日常的に定量するには不向きである。

日常的なタンパク質修飾分析および定量用として、いくつかのモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が開発されている。上

上記のペッファーらは、クロマチンの特異的な領域を同定するのに用い得るポリクローナル抗体を教示している。この抗体はテトラアセチル化型 H4 を認識する。しかし、この抗体は他のアセチル化タンパク質とは交差反応を起こさず、ペッファーらは MAB を教示していない。

また、上記のシュタインブレッシャーも、アセチル化リジンに特異的なポリクローナル抗体を教示している。このポリクローナル抗体は MAB に関するものではない。このポリクローナル抗体は組換えタンパク質と交差反応を起こさず、しかも rbS1 に関するものではない。

発明の概要

本発明は以下のものを提供する：

- (1) rbS1 のアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ；
- (2) ATCC # HB-10181 である上記のハイブリドーマ；
- (3) rbS1 のアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体

特表平5-500007 (4)

であって、遊離のリジンアミノ酸の α -アセチル基と ϵ -アセチル基とを区別することのできるモノクローナル抗体；

(4)抗pI 7 rbSt分子である上記のモノクローナル抗体；

(5)ハイブリドーマATCC# HB-10181により生産される上記のモノクローナル抗体；

(6)IgGクラスに属する上記のモノクローナル抗体；

(7)a)rbStのアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体をrbSt試料に接触させ；

b)該rbStと接触している該モノクローナル抗体を、該モノクローナル抗体とrbStのアセチル化リジン残基との間に免疫学的複合体を形成するのに十分な時間および条件下で保持し；次いで

c)該接触により得られた該免疫複合体の量を検出する工程からなることを特徴とする組換えにより生産されたbStにおけるアセチル化の割合を定量する方法；

(8)a)該モノクローナル抗体を該rbSt試料に接触させる前に、まず、該試料を固体担体上に固定化し；

質量分析法により決定できるが、これらの方法は組換えタンパク質ロットにおけるアセチル化不純物の日常的な定量には不向きである。本発明は、品質管理を目的として、rbStロットを日常的にスクリーニングおよび定量し、そのリジン-アセチル化度を決定する簡単で効果的な手段を提供する。

ハイブリドーマ細胞により生産される単一の抗体として定義されるモノクローナル抗体は、化学的にアセチル化したrbStでCAF/Jマウスを免疫することにより生産される。rbStのアセチル化は無水酢酸を用いて行われる。標準的なハイブリドーマ法を実施した後、IgG MABを単離する。好適な方法は、イー・コリーで調製されたrbStの製造ロットから精製されたアセチル化rbStを用いることである。

アセチル化rbSt(pI 7.0)の定量は、間接的で非競合的な酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いて行われる。rbSt試料は、ポリスチレン製のマイクロタイタープレート上に固定化され、このプレートにMABが添加される。結合MABはペルオキシダーゼ標

b)該結合rbSt試料を次いで該モノクローナル抗体と接触させ；

c)該モノクローナル抗体と結合rbStとの接触を、第1の免疫学的複合体を形成するのに十分な時間および条件下で保持し；次いで

d)該第1の免疫学的複合体を、結合rbStと免疫学的複合体を形成していないモノクローナル抗体を洗い流すことにより検出し、該第1の免疫学的複合体を次いで第2の抗体と接触させて、第2の免疫複合体を形成させ、該第2の抗体には検出可能な指示薬が取り付けられている請求の範囲第7項に記載の方法；

(9)rbStのアセチル化リジン残基に対するモノクローナル抗体がハイブリドーマATCC# HB-10181により生産される上記の方法。

発明の詳細な説明

組換えウシママトロビン(rbSt)におけるリジンのアセチル化は、宿主のイー・コリー(E.coli)により翻訳後修飾として導入された組換えタンパク質中の不純物である。タンパク質におけるアセチル化リジンの存在および位置は、N-末端配列決定法およびFAB

質量分析法により検出される。

本発明によるMABの特異性は、様々な合成rbStペプチドを化学的にアセチル化し、それらを競合ELISAにおける阻害剤として評価することにより、特徴づけられる。

本発明は、以下の実施例により、さらに詳しく例示される。

実施例1

A部 rbStの化学的アセチル化

rbSt試料は確立された手順を用いて化学的にアセチル化される。例えば、[ミーンズ・ジ・イー(Means, G.E.)ら、1971、ケミカル・モディフィケーションズ・オブ・プロテインズ(Chemical Modifications of Proteins)、ホルデン・ケイ・インク(Holden Cay, Inc.)、オークランド、カリフォルニア、214頁、およびフレンケル-コンラット・エイチ(Fraekel-Conrat, H.)、1959、メソッド・エンザイモロジー(Methods Enzymology) 4:247]を参照。水0.1ml中のrbSt約10mgを、0.1mlの飽和酢酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6) [シグマ(Sigma)]と混合する。タンパク質を可溶化するた

特表平5-500007 (5)

めに、0.12gの塩酸グアニジン(Gdn-HCl)〔シュワルツ/マン・バイオテック(Schwarz/Wann Biotech)〕を加えて、最終濃度を6M Gdn-HClとする。この混合物を氷上で30分間冷却する。2μlの無水酢酸〔マリネクロッド(Mallinckrodt)〕を、0℃にて、1時間にわたって、10分ごとに添加する。

4℃にてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に対して48時間透析することにより、無水酢酸およびGdn-HClを除去する。化学的にアセチル化されたrbStは、凍結乾燥され、-20℃で保存される。rbSt分子の様々な断片を含む合成rbStペプチドも同様にしてアセチル化される。

B部 pI 7.0 rbStの精製

rbStのpI 7.0画分は、クロマトフォーカシング法により単離/精製される。30mlの膨潤PBE-94ゲル〔ファーマシア(Pharmacia)〕を1×30cmのカラムに詰め、12ベッド容量(約300ml)の0.025Mエタノールアミン-酢酸緩衝液(pH 9.4)を用いて平衡化/洗浄する。rbStをエタノールアミン緩衝液に溶解

ク質濃度は、係数1.46が6.3ng/mlに対応することを用いて、波長280nmで分光光度法により決定された。精製pI 7.0の等電点電気泳動(IEF)分析によると、pI 6.7~7.2に4つの濃いバンドの果まり(大部分はpI 6.9~7.0に集中していた)と、pI 5.8~6.7に一連のかすかなバンドとが見られた。この試薬「精製pI 7.0」は、タンパク質のpIを8.2領域から7.0領域に変化させるrbSt不純物(例えば、アセチル化型、脱アミド化型、および/またはIso-Asp-99型のrbSt)から構成されている。

精製pI 7.0のrbStおよび精製pI 8.2のrbSt他の型は、共に、99位の通常のアスパラギンをグリシンに置換して製造されたrbStロットから単離される(米国特許出願第07/299,107号(1989年1月19日付で出願)を参照;この米国特許出願は参考文献として、ここに援用する)。このような置換により、アスパラギンからイソアスパルテート99への塩基触媒による再配列(すなわち、Iso-Asp-99 rbSt不純物)が防止される。この発酵から得られるpI 7.0画分「gly-99 pI 7.0」は、アセチル化型rbStおよび脱

した15.4ng/ml溶液をPBEカラムに加え、ポリバッファ-96(ファーマシア)の1/10希釈液を用いて、26ml/hrの流量で溶出させる。画分(各1.5ml)をガラス製試験管に収集し(ISCOフラクションコレクター)、UVモニタ(Agilar ISCO)によるタンパク質検出を行う。2~3ベッド容量(約100ml)の1.0M塩化ナトリウム

(NaCl)溶液を用いて、上記カラムを再生する。pI 7.0の画分をブールし、ポリバッファ両性電解質を硫酸アンモニウム沈澱により除去する。硫酸アンモニウム(NH₄SO₄)を、25℃で飽和度が90%になるように、固体のままでpI 7.0画分に添加する。この溶液を室温で2時間攪拌し、次いで32,000rpm〔ソルバル(Sorval)〕で遠心分離する。沈澱物を飽和NH₄SO₄溶液で3回洗浄し、毎回10,000rpmで遠心分離する。最終的な沈澱物を0.1M NaHCO₃(pH 9.5)で復元し、4℃にて、同緩衝液に対して一晚透析する。精製pI 7.0 rbStの一部を、1.5mlのエペンドルフ蓋付遠心管に採り、-20℃で保存する。精製pI 7.0のタンバ

アミド化型rbStからなる。「Gly-99 pI 8.2」は対応のpI 8.2画分である。これら2つのタンパク質は、凍結乾燥された固体および適当な緩衝液中で復元されたものとして供給される。

rbSt、精製pI 7.0、gly-99 pI 7.0およびgly-99 pI 8.2の等電点電気泳動は、PHA-STE IEF系(ファーマシア)を用いて行われる。PBS中のタンパク質試料(3μlの2~3ng/ml溶液)を、予め固まらせた0.35mmポリアクリルアミドPhastGel IEF pH 3~9ゲル(ファーマシア)に加え、520VH(1910V/2.5mA/35W/15℃)で等電点電気泳動に付す。広範囲のpI補正キット(pH 3~10)(ファーマシア)をpI標準として用い、pH勾配を定める。分離されたタンパク質の存在および位置を可視化するために、IEFゲルは、ファストシステム・ディベロップメント・テクニック(PhastSystem Development Technique) No. 200に概説されている、高速クーマシーブルー染色法により直接染色される。

C部 モノクローナル抗体の製造

フロイント完全アジュバント [ディフコ(Difco)] に乳化させた化学的アセチル化rbSt 50 μ gをCAF₁/Jマウス [ジャクソン・ラボラトリーズ(Jackson Laboratories)] に腹腔腔内投与することにより、これらの動物を免疫する。第2および第3の追加免疫については、化学的にアセチル化されたrbSt 25 μ gをフロイント不完全アジュバントに乳化させ、4週間ごとに腹腔腔内投与することにより行われる。体細胞ハイブリダイゼーションの4日前に行われる最終的な追加免疫では、精製pI 7.0 rbSt 10 μ gをPBS (10 mM Na₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.3) に溶解したものを静脈内(IV)投与する。最も高い力価の抗-アセチル化rbStで免疫されたマウスから得られた脾臓細胞を、確立された手法 [レーン・アール・デイ (Lane, R.D.), 1985, ジャーナル・オブ・イムノロジー・メソッズ(J. Immunol. Methods) 8:223] に従って、SP-2/Oマウス形質細胞腫の細胞系と融合させる。アセチル化rbSt (pI 7.0) およびpI 8.2 特異的免疫グロブリンを生産する培養物を、スクリーニングELISAを用いて検出し、マイクロタイター

次いでタンパク質Aクロマトグラフィーに付される。まず、8 mlの飽和硫酸アンモニウム溶液(シグマ)を、4℃で、8 mlの腹水に滴下し、氷上で1時間攪拌する。この懸濁液を、微小遠心分離機 [5415型, ブリンクマン・インスツルメンツ(Brinkman Instruments)] を用いて、13,000 rpmで遠心分離する。該ペレットを8 mlのPBSに再懸濁し、pH 8.5で0.05 M Na₂PO₄に対して一晚透析する。

タンパク質Aクロマトグラフィーについては、5 mlの膨潤したアフィゲル-プロテイン・エイ(Affigel-Protein A) [バイオ-ラッド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Labs)] を、1×10 cmのカラム(バイオ-ラッド)に詰め、(脱イオン化/蒸留水100 mlあたり3.4 gとして調製した)25 mlのpH 9.0 バイオ-ラッド結合緩衝液で洗浄する。6 mlの透析試料を等容量の結合緩衝液と混合し、カラムに加える。このカラムを50 mlの結合緩衝液で洗浄する。(脱イオン化蒸留水100 mlあたり2.2 gとして調製した)pH 3.0 バイオ-ラッド溶出緩衝液を添加してMABを溶出させ、UVモニタ(A₂₈₀、

プレート [コーニング(Corning)] 中で標準的な限界希釈法を用いて、1個のウェルあたり1個の細胞の割合でクローン化する。選択された陽性のウェルについて、再度クローン化を行い、確立された粒子濃度蛍光免疫学的検定法(PCFIA)を用いて、モノクローナル性および(IgGのような)イソタイプを確認する。モノクローナル抗体を生産する興味あるハイブリドーマを大規模に培養し、細胞系を長期間にわたって凍結保存するために、ストック溶液を凍結する。抗pI 7モノクローナル細胞系および抗pI 8.2モノクローナル細胞系について、0.5 mlのプリスタン [2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン; シグマ・ケミカル・コーポレーション(Sigma Chemical Co.)] を、CAF₁/Jマウスに腹腔腔内注射することにより、腹水を生産する。7日後、10⁶個のモノクローナルハイブリドーマ細胞を、マウスに腹腔腔内注射する。腹水は1〜2週間後に採取される。

抗pI 7モノクローナル抗体および抗pI 8.2モノクローナル抗体は、ネズミの腹水から硫酸アンモニウム分画法により精製され、

ISCO)でタンパク質検出を行いつつ、2 mlずつの画分として採取する(ISCOフラクションコレクター)。この精製手順を腹水試料の各々について繰り返した後、抗pI 7 MABおよび抗pI 8.2 MABに対する溶出画分を別々にブールし、1 Mのトリス緩衝液(pH 9.0)を用いてpH 7に中和し、そしてマイクロ-プロディコン・コンセントレーター(Micro-Prodicon Concentrator) [バイオモレキュラー・ダイナミクス(Biomolecular Dynamics)] で濃縮/透析する。精製抗pI 7 MABおよび抗pI 8.2 MABのタンパク質濃度は、 $\Sigma \epsilon \cdot c \cdot d$ により、それぞれ11.4 mg/mlおよび6.6 mg/mlであると決定される。精製MABは、0.5 mlのエッペンドルフ管付遠心管(バイオ-ラッド)に分注され、-20℃で保存される。

精製抗pI 7 MABおよび抗pI 8.2 MABの特異性は、スクリーニングELISAを用いて確認されるが、その力価は、それぞれ1:1,600,000および1:10,000である。抗pI 7 MABおよび抗pI 8.2 MABは、さらに特徴づけられ、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-

PAGE)に付すと、重鎖(約50,000ダルトン)および軽鎖(約22,000ダルトン)を示すことがわかる。IEF試験によると、各MABについて4〜6個のバンドの集まりが見られ、抗pI 7 MABおよび抗pI 8.2 MABに対する平均的なpIは、それぞれ5.8±0.18および6.4±0.16である。

実施例2

A部 抗pI抗体の特徴づけ

rbStまたは精製pI 7.0 rbStを固体支持体(マイクロタイタープレート、ニトロセルロース)に固定化した場合や、gly-99 pI 7.0 rbStを溶液の阻害剤として用いた場合には、抗pI 7 MABが最もよく機能する。抗pI 7 MABを含む溶液の阻害剤としてのrbStは、1,000 μg/mlの濃度であっても、プレート上に固定化されたそれ自身またはgly-99 pI 7とは競合しない。同様の結果は、精製pI 7.0 rbStを溶液の阻害剤として用いた場合に得られる。これに対して、gly-99 pI 7.0は、gly-99 pI 7.0およびrbStに対して、それぞれ2.4 μg/mlおよび18.8 μg/mlとい

7、ファーマシア・ファストシステム・オーナーズ・マニュアル(Pharmacia Phastsystem Owner's Manual)、トライコンタクト(Tryckkontakt)、ウブサラ、スウェーデン]。拡散プロット法については、ニトロセルロース(バイオラッド)を、IEFゲルよりもわずかに大きい寸法に切断し、PBSに5分間予備浸漬し、そしてすべての気泡を排除するようにしてIEFゲルの上に慎重に設置する。続いて、1枚の(厚い)プロット用濾紙(バイオラッド)を、ニトロセルロースの頂部に設置し、ゲル-ニトロセルロース-プロット用濾紙の全体をゲル乾燥器(バイオラッド)上に倒置して(プロット用濾紙を下側に)、真空下、室温にて、一晚インキュベートする。

免疫学的検定法については、ニトロセルロースをゲルから剥離し、PBS(pH 7.3)中の0.05%ツイーン-20(バイオラッド)を用いて、回転ブラッドフォーム振盪機[アメリカン・ラボ(American Lab)]上で、室温にて2時間ブロックする。PBS中で3回洗浄した後、上記のニトロセルロースを、希釈していない抗pI 7 MAB

う平均的な50%阻害点を与える。rbSt/精製pI 7.0は、タンパク質の立体配座を乱す非イオン系の界面活性剤であるノニデット(Nonidet)P-40(NP-40)を溶液相に導入した場合にのみ競合する。0.5% NP-40の存在下では、rbStは、プレート上に固定化された精製pI 7.0と競合する(50%阻害点は500 μg/ml)のに対し、NP-40が存在しなければ、2,000 μg/mlのrbStであっても、阻害は起こらない。さらに、gly-99 pI 8.2 rbStは、NP-40の有無にかかわらず、抗pI 7 MABと相互作用しない。

1. 免疫プロット

抗pI 7 MABおよび抗pI 8.2 MABの免疫プロット分析は、確立された手順で行われる[ハミルトン・アール・ジ(Hamilton, R.G.)ら、1987、ハイブリドーマ(Hybridoma) 6:265; ジョンスドゥティアー・アイ(Jonsdottir, I.)ら、1984、フェブス・レターズ 67:15; およびファストシステム・ディベロップメント・テクニク・ファイル(PhastSystem Development Technique File) No. 220, 198

または抗pI 8.2 MABの細胞培養物上清と共に、均一に攪拌しながら、室温で2時間インキュベートする。このメンブレンを、PBS中で3回洗浄し、PBS中に1:2,000の割合で希釈されたペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgに浸漬し、そして室温で2時間攪拌する。PBS中で3回洗浄した後、新しく調製したDAB基質(クエン酸-リン酸緩衝液中における0.5 mg/mlの3-3'ジミノベンジジン(Sigma)および0.5 μl/mlの30% H₂O₂)中で、上記のニトロセルロースを室温にて30分間インキュベートすることにより、結合MABを検出する。この緩衝液には、1リットルあたり、29.4 gのクエン酸二水素ナトリウムと、13.8 gのNaH₂PO₄・H₂Oが含まれている(pH 7.5)。このメンブレンを水中ですすいで、風乾することにより、反応を停止させる。抗pI 7 MABは、pI 7およびrbStの試料におけるpI 7およびより酸性のバンドに結合するが、rbStまたはgly-99 pI 8.2の試料のpI 8〜8.2のバンドとは反応性を示さなかった。これに対して、抗pI 8.2 MABは、すべての試料中のpI 8.2およびpI 7のバンド

と交差反応を起こした。

2. 間接的な非競合的ELISA

アセチル化されたrbSt(pI 7.0)の定量は、ポリスチレン製のマイクロタイタープレート上に固定化されたrbSt試料を用いた間接的な非競合的ELISAにより行われ、結合MABはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGにより検出される。固定化タンパク質(例えば、pI 7、pI 8.2、rbSt、化学的にアセチル化されたrbSt)の検量線は、まずこのタンパク質を重炭酸緩衝液(pH 9.6)中に20 µg/mlまで希釈することにより調製される。この溶液を、ポリエチレン製の遠心管(コーニング)中で、重炭酸緩衝液を用いて、順次2倍に希釈し、得られた希釈液を、引き続いてImulon IIマイクロタイタープレートの各カラムに、各ウェルあたり100 µlの割合で移す。ペルオキシダーゼ抗マウスIgG複合体の適当な希釈率(1:3,000)は、様々な濃度について試験し、結合抗体が存在しない場合のバックグラウンド(負の対照)の応答が 1.0×10^{-1} ODであるのに対し、rbStの検量線に対して最大(最も高感度)のOD値

2.0 ml、および/または阻害剤を1:10に希釈するのに必要な容量)を含むポリプロピレン製の遠心管中で、同じ緩衝液を用いて、順次2倍に希釈する。抗pI 7 MABの1.8 µg/ml溶液を、1%ゼラチン-PBS中に調製し、既知量(通常、各250 µl)を、阻害剤-1%ゼラチン-PBS混合物を含む各遠心管に移す。これらの遠心管をボルテックススターにかけ、室温で45分間インキュベートする。阻害剤が存在しない場合にはOD約1.0を与える濃度として、適当なMAB希釈率を選択した。検定用の負の対照を作成するには、抗pI 7 MABを正常なマウス血清(NMS)または1%ゼラチン-PBSで置き換え、阻害剤を重炭酸緩衝液で置き換える。検定用の正の対照は、阻害剤を含まない溶液(添加された重炭酸緩衝液のみ)中の抗pI 7 MABからなる。45分間インキュベートした後、固定化された精製pI 7またはrbStを含む、ブロック化され、かつ洗浄されたマイクロタイタープレートの各カラムに、(各ウェルあたり100 µlの)MAB-阻害剤溶液を移す。これらのプレートは室温で2時間インキュベートする。3回洗浄した後、1%

を与えるものを選択することにより、決定される。

検定は、0.15~2.5 µg/mlの範囲内にわたって直線的である。

基準としたrbStのうち、約32%はpI 7.0であったが、相対的な標準偏差(RSD)は13%であった。10個の異なるrbStロットを、3日間の各々の日に、基準のものに対して検定すると、21.3~38.7%がpI 7.0であり、平均のRSDは6.8%である。

3. 競合的ELISA

MABの特異性/エピトープの特徴づけは、様々な合成rbStペプチドを化学的にアセチル化し、それらを競合的ELISAの阻害剤として評価することにより、調べられる。イムロン(Imulon)IIマイクロタイタープレートのウェルを、精製抗pI 7.0またはrbStの10 µg/ml溶液で被覆し、引き続いて、PBS(pH 7.3)中の1%ゼラチン(Bio-Rad)を用いて、室温で1.5時間ブロックする。適当な初期濃度の阻害剤(通常、供給量に依存して、1~10 µg/ml)を、重炭酸緩衝液(15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6)中に調製し、1%ゼラチン-PBS緩衝液(通常、各遠心管あたり

ゼラチン-PBS中に比率1:3000で希釈されたペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG [サザーン・バイオテック(Southern Biotech)]の100 µlを、室温で2時間にわたって各ウェルに添加する。結合抗体の検出を行う前に、0.4 µl/mlの3.0% H_2O_2 (マリンクロッド)を含む0.1 Mのクエン酸- K_2HPO_4 緩衝液(pH 4.5)中の0.4 µg/mlオルト-フェニレンジアミン(シグマ)を、各ウェルあたり200 µl添加することにより、プレートを4回洗浄する。暗所にて、室温で30分間インキュベートした後、2.5 M H_2SO_4 (マリンクロッド)を各ウェルあたり50 µl添加することにより、反応を停止させる。データ記憶および分析用のIBM-PCXTクローン [ファウンティン(Fountain)] に接続したマイクロタイタープレート読取装置 [EL310型、バイオテック(Biotek)] を用いて、490 nmにおけるウェルの光学密度を測定する。

阻害剤は、様々な合成rbStペプチドと、単一のリジン基を様々な隣接アミノ酸と共に含む市販ペプチドとのアセチル化型および非アセチル化型からなる。合成rbStペプチドは、[メリフィールド・

アール (Merrifield, R.), 1963, ジャーナル・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ (J. Amer. Chem. Soc.) 85:2154] に従って調製される。ゼノブシン、エロドイシンおよび血清胸腺因子 (STF) は、ケマログ (Chemalog) から購入され; ニューロテンシン、両ブラジニン、リジン、 α -アセチルリジンおよび ϵ -アセチルリジンは、シグマから購入され; そして、セルバ (Serva) からは、「Fo-phe-set-phe-lys」が供給される。

合成 rbSt ペプチド阻害剤およびその 50% 阻害点を、応答が減少する順番に並べると、rbSt アミノ酸残基 152~177 (0.39 μ g/ml) > rbSt アミノ酸残基 130~150 (7.8 μ g/ml) > rbSt アミノ酸残基 179~191 (18.8 μ g/ml) となる。阻害度は、アセチル化リジン残基の数に対して相関を示す。これらペプチドの正常な非アセチル化型は、500 μ g/ml であっても、検定において競合を起こさない。エピトープをさらに明確にするためには、単一のリジンを様々な隣接アミノ酸と共に含む様々な市販のペプチドをアセチル化し、阻害剤として評価する。得られたデータによる

と、MA B は、タンパク質中の少なくとも 1 個の単一アセチル化リジン残基の存在に特異的であるだけでなく、 α -アセチルリジンと ϵ -アセチルリジンとを遊離のアミノ酸として区別し得る。

本発明の好適なハイブリドーマおよびモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ VH 25-1 E 5-2 D 1-2 B 8 (p17.0 またはアセチル化リジン抗体) により生産される。このハイブリドーマは、UC[®] HB-21 と名づけられ、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタベスト条約の規定に基づき、1989年7月14日付で、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション [12301 パークローン・ドライブ (Parklawn Drive)、ロックビル、MD 20852、USA] に寄託されている。受託番号は HB-10181 である。

国際調査報告

International Application No.

PCT/US 90/03879

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (In cases where classification is made by applicant, indicate I.P.C. Class.)		
Int. Cl. 5 C12P 21/08 ; C12N 5/18 ; G01N 33/577		
II. FIELD OF SEARCH		
Classification System		
Int. Cl. 5	C07K ; C12P ; G01N	
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*		
Category*	Character of Document, ** with abstracts, where appropriate, of the relevant passages**	Relevant to Claim No. (1)
X, P	FASEB JOURNAL vol. 4, no. 7, 26 April 1990, BETHESDA, MD US page 1890 D.M. Evans: "Monoclonal antibody to acetylated lysine residues in recombinant bovine somatotropin" see abstract 1149	1-9
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 83, (11), 1987 page ab-345, biosciences information services phil. Kriwi, G. et al: "Antigenic regions of bovine..." abstract number 106644 see abstract	1-9
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 261, no. 6, 25 February 1986, BALTIMORE US pages 2496 - 2498; Ulrich Pfeffer et al: "Availability of Hyperacetylated H4 histone in intact nucleosomes to specific antibodies" see the whole document	1-9
* "Special category of cited documents:"		
** "Documents affecting the prior art of the invention in which the invention is not disclosed to be a prior art reference."		
** "Documents published after the international filing date of the invention but prior to the date of publication of the international patent application, which documents are not prior art references but are relevant to the invention."		
** "Documents published after the international filing date but prior to the date of publication of the international patent application, which documents are not prior art references but are relevant to the invention."		
IV. CERTIFICATION		
Date of the International Search Report		Date of Filing of the International Search Report
29 JANUARY 1991		13.02.91
International Searching authority		Examiner of the International Search Report
EUROPEAN PATENT OFFICE		SEANWILLIAMS F.

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
G 01 N 33/53	D	8310-2J
33/577	B	9015-2J
//(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

⑥発 明 者 ウオーカー, ガスタバス・エイ アメリカ合衆国ミシガン州49081、ボーテイジ、ミッドフイールド・ドライブ5125番